

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
31. Mai 2001 (31.05.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/38349 A2

(51) Internationale Patentklassifikation?: C07K 14/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/11770

(22) Internationales Anmeldedatum:  
25. November 2000 (25.11.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 57 043.4 26. November 1999 (26.11.1999) DE

(71) Anmelder und  
(72) Erfinder: FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Böhrerstrasse 5, 30175 Hannover (DE).

(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ADERMANN, Kaut [DE/DE]; Niedersächsisches Institut für Peptid-Forschung GmbH (IPF), Feodor-Lynen-Strasse 31, 30625 Hannover

(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 1022 41, 50462 Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TI, TM, TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,

*[Fortsetzung auf der nächsten Seite]*

(54) Title: NOVEL  $\beta$ -DEFENSINS

(54) Bezeichnung: NEUE  $\beta$ -DEFENSINE

a

|      |  |
|------|--|
| mBD1 | ILTSLGRRTDQYKCLQHGGFLRSSCPSNTKLQGDKCPDKPKNCKS      |
| mBD2 | SLKSIGYEAEILDHICHTNGGYCVRACPPSARRPSGCFPEKNECCYKMK  |
| mBD3 | KKINNPVSCLRKGGRG-WNRCIGNTROQIGSCGVPPFLKCKRK        |
| mBD4 | FTQIINNPITCMTNGAIC-WGECPTAFRQIGNCGHFKVRCCKIR       |
| mBD5 | QDINSKRACYREGGEC-LQRCIGLFHKIGCNFRF-KCCKFQIPEKKTKIL |
| mBD6 | QKINEPVSCIRNGGIC-QYRCIGLRLHKIGCSPF-KCK             |
| hBD1 | GNFLTGLGHRSRSDHYNCVSSSGGQCLYSACPIFTKIQGICYRGKAKCKK |
| hBD2 | GIGDPVTICLKSGATCIPVFCPRRYKQISGGLPGTYCKCKP          |

b

|      |  |
|------|--|
| mBD5 | QDINSKRACYREGGEC-LQRCIGLFHKIGCNFRF-KCCKFQIPEKKTKIL |
| mBD6 | QKINEPVSCIRNGGIC-QYRCIGLRLHKIGCSPF-KCK             |

(57) Abstract: The invention relates to beta-defensins of the formula  $Z^1\text{-RCIGLXHKIGTC-Z}^2$ , wherein?  $\text{Z}^1 = \text{F or R}$  and  $\text{Z}^1$  and  $\text{Z}^2$  are equal to each other or different from one another,  $\text{Z}^1$  represents a substituted or unsubstituted amino acid residue, having at least one additional cysteine,  $\text{Z}^2$  represents either a peptide residue of up to 20 amino acids, having at least two immediately adjacent cysteines or a carboxyl group or derivatized carboxyl group. The novel defensins can be used as antibiotic medicaments.

(57) Zusammenfassung:  $\beta$ -Defensine der Formel  $Z^1\text{-RCIGLXHKIGTC-Z}^2$  wobei  $\text{X} = \text{F oder R}$  ist und  $\text{Z}^1$  und  $\text{Z}^2$  gleich oder verschieden sind,  $\text{Z}^1$  einen substituierten oder unsubstituierten Aminosäurerest mit mindestens einem weiteren Cys bedeutet,  $\text{Z}^2$  entweder ein Peptidrest von bis zu 20 Aminosäuren ist, mit mindestens zwei unmittelbar benachbarte Cys oder eine Carboxylgruppe oder derivatisierte Carboxylgruppe bedeutet. Die beschriebenen Defensine können als antibiotisch wirksame Arzneimittel eingesetzt werden.

WO 01/38349 A2



FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

*Zur Erklärung der Zwei- und Dreistaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.*

**Veröffentlicht:**

- *Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.*

Neue  $\beta$ -Defensine

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind neue  $\beta$ -Defensine gemäß Anspruch 1, Arzneimittel enthaltend die erfindungsgemäßen  $\beta$ -Defensine sowie Verwendungen der erfindungsgemäßen  $\beta$ -Defensine.

Defensine sind Polypeptide mit antibiotischer Wirkung. Aufgrund der zunehmenden Antibiotikaresistenz insbesondere von pathogenen Mikroorganismen ist es dringend erforderlich, das Arsenal der antibiotisch wirksamen Substanzen zu ergänzen, um diese Mikroorganismen erfolgreich zu bekämpfen. Defensine werden in Säugern in verschiedenen Geweben und Organen exprimiert.

Das der Erfindung zu Grunde liegende technische Problem bestand darin, weitere wirksame Defensine zur Verfügung zu stellen, die unter anderem als Arzneimittel eingesetzt werden können.

Erfindungsgemäß gelöst wird das angesprochene technische Problem durch  $\beta$ -Defensine der Formel



wobei

X = F oder R ist und

Z<sup>1</sup> und Z<sup>2</sup> gleich oder verschieden sind,

Z<sup>1</sup> einen substituierten oder unsubstituierten Aminosäurerest mit mindestens einem weiteren Cys bedeutet,

- 2 -

$Z^2$  entweder ein Peptidrest von bis zu 20 Aminosäuren mit mindestens zwei unmittelbar benachbarten Cys oder eine Carboxylgruppe oder eine derivatisierte Carboxylgruppe bedeutet.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen  $\beta$ -Defensins bedeutet  $Z^1$  QDINSKRACYREGGECLQ und/oder QKINEPVSCIRNGGICQY und  $Z^2$  NFRFKCCKFQIPEKKTKIL und/oder GSPFKCCK.

Fig. 1a zeigt einige Aminosäuresequenzen von humanen und murinen  $\beta$ -Defensinen. Die erfindungsgemäß besonders bevorzugten  $\beta$ -Defensine sind mBD5 (Seq ID. No 1) und mBD6 (Seq ID. No 2). Die anderen Sequenzen mBD1 bis mBD4 stammen aus der Maus und sind an sich bekannt, ebenso wie die Sequenzen hBD1 und hBD2. Letztere stammen aus dem Menschen.

Fig. 1b zeigt die erfindungsgemäßen  $\beta$ -Defensine mBD5 (Seq ID. No 1) und mBD6 (Seq ID. No 2).

Fig. 2 zeigt ein Expressionsmuster des erfindungsgemäßen  $\beta$ -Defensins mBD5 in verschiedenen Geweben oder Organen der Maus. Die Ordinate ist in relativen Expressionseinheiten angegeben.

Fig. 3 zeigt ein Expressionsmuster des erfindungsgemäßen  $\beta$ -Defensins mBD6 in verschiedenen Geweben oder Organen der Maus. Die Ordinate ist in relativen Expressionseinheiten angegeben.

Fig. 4 zeigt in Tabellenform die minimale Hemmkonzentration (MIC minimum inhibitory concentration) der erfindungsgemäßen  $\beta$ -Defensine gegenüber verschiedenen Mikroorganismen. Die Werte sind in  $\mu\text{g/mL}$  angegeben.

Fig. 5 zeigt eine Dosis-Wirkungskurve der erfindungsgemäßen  $\beta$ -Defensine. Die Ordinate der oberen Kurve zeigt als Angabe den cfu-wert (colony forming units), die Abszisse die steigende Konzentration des  $\beta$ -Defensins mBD5 sowie die daraus abgeleitete Ermittlung des  $IC_{50}$  Wertes (inhibitory concentration) für mBD5 gegen *E. coli*. Die untere Kurve zeigt dies entsprechend für mBD6.

Fig. 6 zeigt die Regulierung des erfindungsgemäßen  $\beta$ -Defensins mBD5 in NIH-3T3 Zellen. Die Ordinate zeigt relative Expressionseinheiten.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel enthalten als wirksamen Bestandteil mindestens ein erfindungsgemäßes  $\beta$ -Defensin. Dem Fachmann sind die gegebenenfalls zur Formulierung der  $\beta$ -Defensine als Arzneimittel einsetzbaren Hilfs- und Trägerstoffe geläufig. Die  $\beta$ -Defensine können in Mengen eingesetzt werden, die durch ihre therapeutische Breite definiert sind. Typischerweise werden sie in Mengen von 1  $\mu$ g bis 100 mg eingesetzt.

Die Formulierungen der erfindungsgemäßen  $\beta$ -Defensine als Lösung für intravenöse, intramuskuläre, subkutane und topische Applikation sind bevorzugt.

Die erfindungsgemäßen  $\beta$ -Defensine sind zur Behandlung von Infektionen geeignet. Insbesondere können die erfindungsgemäßen  $\beta$ -Defensine als antibiotisch wirksame Substanzen eingesetzt werden. Das antibiotische Spektrum der erfindungsgemäßen  $\beta$ -Defensine ist weit und reicht zum Beispiel zur Behandlung von Infektionen durch multiresistente Erreger, wie Streptokokkus, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Staphylokokkus* und *Candida*.

Patentansprüche1.  $\beta$ -Defensine der Formel $Z^1\text{RCIGLXHKIGTC-Z}^2$ 

wobei

X = F oder R ist und

 $Z^1$  und  $Z^2$  gleich oder verschieden sind, $Z^1$  einen substituierten oder unsubstituierten Aminosäurerest mit mindestens einem weiteren Cys bedeutet, $Z^2$  entweder ein Peptidrest von bis zu 20 Aminosäuren ist, mit mindestens zwei unmittelbar benachbarte Cys oder eine Carboxylgruppe oder derivatisierte Carboxylgruppe bedeutet.2.  $\beta$ -Defensin gemäß Anspruch 1, wobei $Z^1 = \text{QDINSKRACYREGGECLQ}$  und/oder  $\text{QKINEPVSCIRNGGICQY}$  ist.3.  $\beta$ -Defensin gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei $Z^2 = \text{NFRFKCCKFQIPEKKTKIL}$  und/oder  $\text{GSPFKCCK}$  ist.4. Arzneimittel enthaltend als wirksamen Bestandteil ein  $\beta$ -Defensin gemäß Anspruch 1, 2 oder 3.5. Verwendung eines  $\beta$ -Defensins nach Anspruch 1, 2 oder 3 als antibiotisch wirksame Substanz.

- 5 -

6. Verwendung eines  $\beta$ -Defensins nach Anspruch 1, 2 oder 3 zur Behandlung von Infektionen, insbesondere durch multiresistente Erreger, wie Streptokokus, Bacillus, Pseudomonas, Echerichia, Staphylokokkus und Candida.
  
7. Verwendung eines  $\beta$ -Defensins nach Anspruch 1, 2 oder 3 zur Behandlung von Infektionen des Magen-Darm-Traktes, insbesondere durch Helicobacter pylori.

|      |   |
|------|---|
| mBD1 | ILTSILGRRTDQYKCLQHGGFCLRSSCPSNTKLQGTCCKPDKPNCCKS    |
| mBD2 | SLKSIGYEAEELDHCHTNGGYCVRAICCPSPSARREGSCCFPEKNBCCYMK |
| mBD3 | KKINNPVSCLRKGRC-WNRQIGNTRQIGSCGVPFLKCCKRK           |
| mBD4 | FTQIINNPITCMTNGAIC-WGPCTAFRQIGNCGHFVKRCCKIR         |
| mBD5 | QDINSKRACYREGGEC-LQRCIGLFHKIGTCNFRF-KCCKFQIPEKKTKIL |
| mBD6 | QKINEPVSCIRNGGIC-QYRCIGLRHKIGTCGSPF-KCCK            |
| hBD1 | GNFLTGLGHRSDDHNCVSSGGCLYSACPIFTKIQGTCYRGKAACCK      |
| hBD2 | GIGDPVTCLKSGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCCKP           |

Figur 1a

mBD5            QDINSKRAQYREGGEQ-LQRQIGLFHKIGTCNFRF-KCCKFQIPEKKTKIL  
mBD6            QKINEPVSQIRNGGQ-QYRQIGLRHKIGTCGSPF-KCCK

Figur 1b

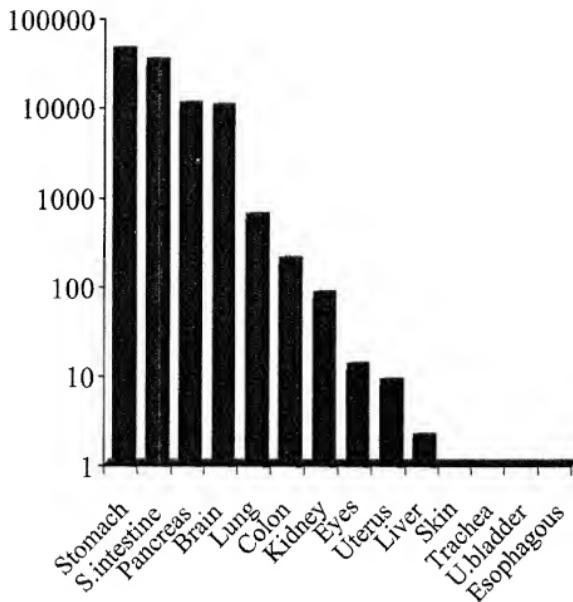
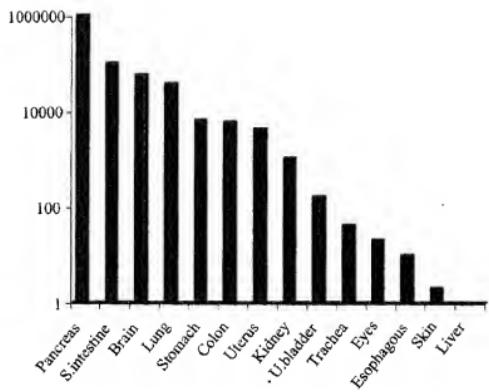


Figure 2



Figur 3

|      | <i>S. carnosus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>B. megaterium</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. coli</i> BL21 |
|------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| mBD5 | 10                 | 12.5               | 5                    | 125                  | 70                  |
| mBD6 | 60                 | 31.5               | 7.5                  | >250                 | >500                |

Figure 4

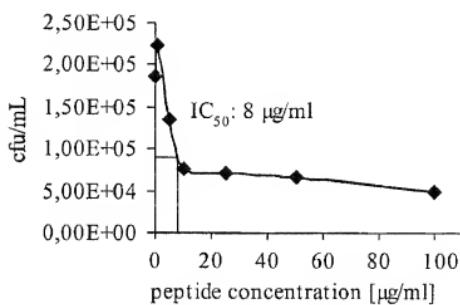
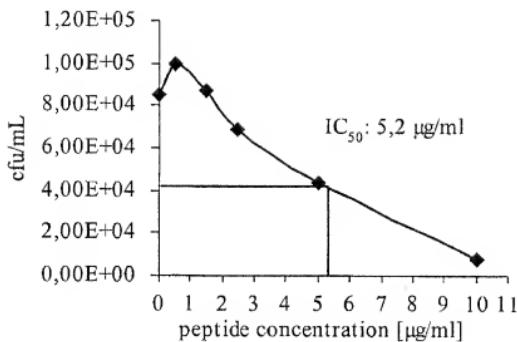


Figure 5

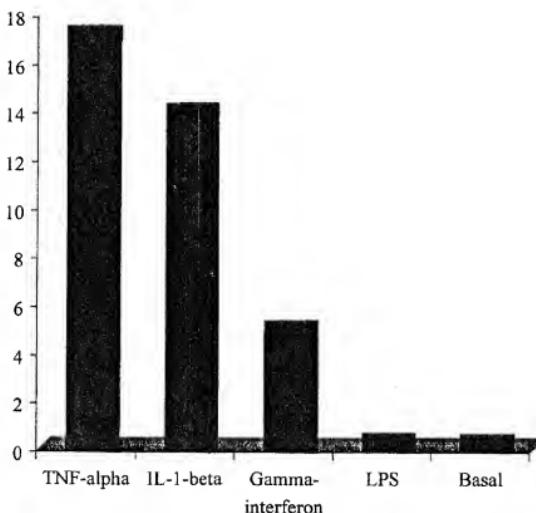


Figure 6

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Forssmann, Wolf-Georg

&lt;120&gt; Neue Defensine

&lt;130&gt; 002168wo Defensine

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 49

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Asp | Ile | Asn | Ser | Lys | Arg | Ala | Cys | Tyr | Arg | Glu | Gly | Gly | Glu | Cys |
| 1   |     |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Gln | Arg | Cys | Ile | Gly | Leu | Phe | His | Lys | Ile | Gly | Thr | Cys | Asn | Phe |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Phe | Lys | Cys | Cys | Lys | Phe | Gln | Ile | Pro | Glu | Lys | Lys | Thr | Lys | Ile |
|     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

Leu

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Lys | Ile | Asn | Glu | Pro | Val | Ser | Cys | Ile | Arg | Asn | Gly | Ile | Cys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Gln | Arg | Cys | Ile | Gly | Leu | Arg | His | Lys | Ile | Gly | Thr | Cys | Gly | Ser |
|     |     |     |     | 20  |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Phe | Lys | Cys | Cys | Lys |
|     |     | 35  |     |     |     |